

专利号: 93105702.7, 公开号: CN 1098103C

交感人类白细胞干扰素的制药用途

Pharmaceutical Application of sympathetic human leucocyte interferon

Abstract:

The present invention relates to methods for treatment of abnormal cellproliferation, virus infection and methods to avoid obvious side-effect usually caused by interferon. These methods include using effective dosage of human sympathetic leucocyte interferon. The present invention also relates to a preparation of sympathetic leucocyte interferon.



附件 76 用途

[19] 中华人民共和国国家知识产权局

[51] Int. Cl<sup>7</sup>

A61K 38/21 A61P 31/12

A61P 35/02



# [12] 发明专利说明书

[21] ZL 专利号 93105702.7

[45] 授权公告日 2003 年 1 月 8 日

[11] 授权公告号 CN 1098103C

[22] 申请日 1993.4.15 [21] 申请号 93105702.7

[30] 优先权

[32] 1992.4.15 [33] US [31] 868,916

[73] 专利权人 安姆根有限公司

地址 美国加利福尼亚州

[72] 发明人 L·M·左拉特 M·W·泰勒

[56] 参考文献

JOURNAL OF INTERFERON RESEARCH VOL  
12 1992. 2. 1 on ozes 等 a comparison of interfer-  
on - conl with natural recombinat interferon -  
antiviral antural kille

JOURNAL OF IMMANOTHERAOPY VOL. 11  
1992. 4. 3 of haigr cell leukemia with granulocyte  
cdong - stimulating factor and recom binant consen  
Sus interfero

审查员 贾书瑾

[74] 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公司

代理人 汪 洋

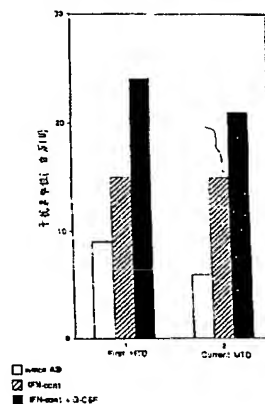
权利要求书 2 页 说明书 22 页 附图 8 页

[54] 发明名称 交感人类白细胞干扰素的制药用途

[57] 摘要

本发明公开了用于治疗细胞增殖失调、病毒感染以及其他不引起通常与干扰素治疗有关的明显的副作用的方法,这些方法包括根据需要施用具有疗效量的交感人类体白细胞干扰素。本发明还公开了交感人类体白细胞干扰素的药物制剂。

对三个治疗组中值效应药剂量(MTD) (按百万单位)



1. 交感人类白细胞干扰素在制备用于治疗用干扰素可以治疗的疾病，并且降低或消除与施用干扰素有关的一种或多种副作用的药物中的应用。
2. 权利要求 1 的应用，其特征在于所述疾病是细胞增殖失调或病毒疾病。
3. 权利要求 2 的应用，其特征在于所述疾病是甲型肝炎、乙型肝炎、丙型肝炎或δ型肝炎。
4. 权利要求 2 的应用，其特征在于所述病毒疾病选自：人类免疫缺陷病毒、疱疹病毒、乳头状瘤、痘病毒、细小核糖核酸病毒、腺病毒、鼻病毒、HTLV I、HTLV II 以及人类旋转病毒。
5. 权利要求 1 的应用，其特征在于所述的副作用选自头痛、发烧、发冷、恶心、食欲缺乏、抑郁、失眠。
6. 权利要求 2 的应用，其特征在于细胞增殖失调是多毛细胞白血病或慢性骨髓白血病。
7. 权利要求 2 的应用，其特征在于细胞增殖失调是卡波济氏肉瘤。
8. 权利要求 1 的应用，其特征在于所述交感人类白细胞干扰素选自 IFN-con<sub>1</sub>、IFN-con<sub>2</sub> 以及 IFN-con<sub>3</sub>。
9. 权利要求 1 的应用，其特征在于所述交感人类白细胞干扰素是 IFN-con<sub>1</sub>。
10. 权利要求 1 的应用，其特征在于所述交感人类白细胞干扰素是外源 DNA 顺序的原核生物表达产物。
11. 交感人类白细胞干扰素在制备用于治疗病毒疾病并不会产生一种或多种极限剂量毒性的药物中的应用。
12. 交感人类白细胞干扰素在制备用于治疗细胞增殖失调或病毒

感染并不会引起通常与干扰素治疗有关的明显的副作用的药物中的应用。

## 交感人类白细胞干扰素的制药应用

本发明涉及用交感人类的白细胞干扰素治疗疾病的方法，本发明还涉及适于治疗疾病的交感人类白细胞干扰素的药物制剂。

干扰素是具有抗病毒和抗增殖两种活性的胞质分裂体(cytokines)的一个亚纲。按生物化学和免疫特性区分，人类干扰素分为三类：干扰素- $\alpha$  (白细胞)、干扰素- $\beta$  (成纤维细胞)和干扰素- $\gamma$  (免疫细胞)。通过对表征这些多肽的DNA进行分离和排序，现已至少鉴定出14种具有特定的氨基酸顺序的 $\alpha$ 干扰素(分类为亚型A-H)。由于 $\alpha$ 干扰素具有抗病毒和抗肿瘤生长抑制作用，它已受到人们广泛的注意，人们已考虑把它作为可能的治疗药剂。

美国专利4503036 中描述了对从全血的血沉棕黄层部分中分离出的人类白细胞干扰素进行纯化的方法。按这个方法制备的人类白细胞干扰素含有不同的人类白细胞干扰素氨基酸顺序的混合物。当在MDBK牛细胞系上试验时，该纯化材料的特异活性为 $0.9 \times 10^8 - 4 \times 10^8$  单位/mg蛋白质，而当在Ag1732 人类细胞系上试验时，特异活性为 $2 \times 10^8 - 7.6 \times 10^8$  单位/mg蛋白质。美国专利4241174 中公开了用亲细胞效应抑制检验法来测定干扰素抗病毒活性的方法。用国家卫生研究所(the National Institutes of Health) 提供的人类白细胞干扰素作为参考标准来校正所测得的干扰素活性。

美国专利4530901中公开了重组DNA质粒的结构(所述的质粒含

有代表至少部分人类白细胞干扰素的顺序) 以及在具有人类白细胞干扰素免疫或生物活性的一多肽在*E. coli*中的表达。

美国专利4414150, 4456748和4678751中公开了包含不同亚型顺序(如A和D、A和B以及A和F)结合的杂种 $\alpha$ 干扰素基因的结构。

美国专利4695623和4897471公开了多种具有氨基酸顺序的新的 人类白细胞干扰素多肽, 它们具有包括在自然界出现 $\alpha$ 干扰素亚型多肽中每个位置找到的一般的或占优势的氨基酸顺序, 并被称作交感人类白细胞干扰素(IFN-Con)。所公开的IFN-Con氨基酸顺序指定为IFN-Con1, IFN-Con2, c IFN-Con3。所述的专利中还公开了对基因进行编码的IFN-Con的制备方法和所述基因在*E. coli*的表达。

Klein 等人在*J. Chromatog.* 454, 205-215 (1988)中描述了在*E. coli*中制造IFN-con1的纯化方法, 据报道, 用这种方式纯化的IFN-con1在用T98G人类细胞系检验亲细胞效应抑制检验法中测量时, 具有 $3 \times 10^9$ 单位/mg蛋白质特异活性(Fish et al. *J. Interferon Res.* 9 97-114 (1989))。用等电聚焦法测定时可以发现, 纯化的IFN-con1包括三个异构型, 分别为甲硫氨酰IFN-con1, 脱甲硫氨酰IFN-con1以及N末端被乙酰基阻断了的脱甲硫氨酰IFN-con1 (Klein 等人, *Arch. Biochem. Biophys.* 276 531-537 (1990))。

美国和一些其他国家已批准 $\alpha$ -干扰素用于治疗多毛细胞白血病、性病湿疣, 卡波济氏肉瘤(Kaposi's Sarcoma, 一种AIDS 病人容易感染的癌症), 以及慢性非-甲非乙型肝炎。 $\alpha$ 干扰素的两种变体已被批准用于治疗用途: 干扰素- $\alpha$ -2a, 商标为Roferon-A 以及干扰素 $\alpha$ -2b, 商标为INTRON-A。Roferon-A和INTRON-A的氨基酸顺序除在

一个位置不同外,在其它位置与 $\alpha$ 干扰素亚型2(亚型A)的氨基酸顺序完全相同。

除了标明的指示外, $\alpha$ 干扰素在多种其他细胞增生失调症中可以单独使用或被评价,或与化学治疗剂配合使用,所述的细胞增生失调症包括慢性骨髓白血病、多样骨髓病、表面膀胱癌、皮肤癌(基细胞癌和恶性黑素瘤)、肾细胞癌、卵巢癌、低级淋巴瘤和皮肤T细胞淋巴瘤,以及神经胶质瘤。 $\alpha$ 干扰素与其他化学治疗剂结合可以有效地治疗由肺癌、结肠直肠癌和乳房癌引起的硬肿瘤(见Rosenberg等人的'Principle and Applications of Biologic Therapy' in cancer: Principle and Practices of Oncology, 3rd ed., Devita 等人, eds. pp.301-547 (1989), Balmer DICP, Ann Pharmacother 24, 761-768 (1990))。

现已知道, $\alpha$ 干扰素影响多种细胞功能,包括在正常和异常细胞中的DNA复制、RNA和蛋白质合成。这样,干扰素不但对肿瘤或病毒感染的细胞有细胞毒性,而且这种细胞毒性在正常的健康细胞中也有所表现。结果,在干扰素治疗中,特别在需要高剂量时会出现不良的副作用。施用干扰素可能导致骨髓抑制,从而减少红细胞、白细胞和血小板的水平。高剂量干扰素通常会引起类似流行性感冒的症状(如:发烧、疲劳、头痛和发冷),胃肠道混乱(如缺乏食欲、恶心和腹泻),目眩和咳嗽。在不减少干扰素治疗优点的情况下,减少或消除这种治疗的不良的副作用将是有用的。

因此,本发明的一个目的是提供对干扰素治疗敏感疾病的治疗方法,其中与现行的实际治疗方法相比,通常由 $\alpha$ -干扰素治疗法引



起的不良的副作用被显著降低或完全抑制掉。本发明的另一个目的是, 与现行的实际治疗方法相比, 提高用干扰素治疗疾病的治疗效果并不会相应地增加不良的副作用的频率或严重程度。

本发明包括对一种干扰素疗法敏感的疾病的治疗方法, 包括对哺乳动物(最好是人)施用具有疗效量的交感人类白细胞干扰素(IFN-con)。本发明是基于这样一个发现, 即IFN-con在病人中引起的副作用不象 $\alpha$ 干扰素那样大。本发明可以治疗的疾病一般都对 $\alpha$ 干扰素治疗法敏感。换句话说, IFN-con有助于治疗那些用 $\alpha$ 干扰素(如Intron A)治疗的同样疾病, 这些疾病例如可以包括(但不限于)细胞增生失调和病毒感染。IFN-con有助于治疗与癌症经常有关的细胞增生失调症。这种失调包括(但不限于)多毛细胞白血病和卡波济氏肉瘤。IFN-con可以单独使用, 或与其他用于治疗癌症和其他增生失调治疗手段结合使用。在一个优选的实施例中, IFN-con与具有疗效量的一个或多个刺激骨髓细胞增殖或分化的因子(例如粒性白细胞群体刺激因子(G-CSF)粒性白细/巨噬细胞群体刺激因子(GM-CSF)、内白细胞杀菌素-1(IL-1)、内白细胞杀菌素-3(IL-3)、内白细胞杀菌素-6(IL-6)、红血球生成素、以及干细胞因子(SCF)组合使用。G-CSF是与IFN-con共同使用的优选因子。

用IFN-con可治疗的病毒疾病包括(但不限于)甲型肝炎、丙型肝炎、其他非甲非乙型肝炎、乙型肝炎、疱疹病毒(EB、CML、单纯性疱疹)、乳头状瘤、痘病病毒、细小核糖核酸病毒、鼻病毒、HTLV I、HTLV II、以及人体旋转病毒(rotavirus)。

虽然早已了解上述疾病可以用 $\alpha$ 干扰素治疗, 但伴随这种治疗

的副作用严重限制了这种治疗的总的有效作用。在某些情况中, 例如Epstein-Barr感染(非洲淋巴瘤感染), 伴随 $\alpha$ 干扰素治疗的副作用实际上排除了用 $\alpha$ 干扰素治疗的可能性。因此, 就本发明而言, 用IFN-con可治疗的疾病包括这样一些疾病, 在这些疾病中,  $\alpha$ 干扰素治疗表现一些效果, 但它不能用已知的干扰素治疗, 因为负的副作用胜过该治疗的效果。现已发现(并且在此公开), 与 $\alpha$ 干扰素治疗法相比, 用选自交感人类细胞干扰素(IFN-con)的非天然存在的干扰素治疗可以大大降低或完全消除副作用。不论所治疗的是何种疾病, 都希望降低或消除副作用。

已有技术的报道结果不可能来预言减少或消除对于IFN-con所发现的副作用。实际的临床结果清楚地证明, 不但与 $\alpha$ 干扰素同样剂量水平的IFN-con可以降低或消除副作用, 而且施用3-5倍的IFN-con也不引起极限剂量的副作用。

此外, 下面将表明, IFN-con的活性类似于或高于上面描述中所指出的INTRON A的活性。特别是IFN-con的抗增生活性比INTRON A高。因此, 与其他目前使用的干扰素疗法相比, 用IFN-con治疗细胞增殖混乱的效果和安全性更高, 与目前实际方法相比, 施用具有疗效量的IFN-con-治疗细胞增生混乱症的效果更快、更彻底, 而且不会相应地增加不良的副作用的出现频率或严重程度。此外, IFN-con的疗效量可能比目前实际使用方法中所用的干扰素的量更低。结果, 在某些情形中, 较少剂量的IFN-con可以得到与较高剂量的其他干扰素相同的疗效, 而且降低或消除了目前使用的与干扰素疗法有关的不良副作用。

IFN-con是一种具有抗增殖活性的非天然存在的多肽。优选的情形是, IFN-con是一具有IFN-Con1、IFN-con2或IFN-con3氨基酸顺序的多肽, IFN-con的氨基酸顺序最好为IFN-con1。

本发明还涉及一种药物制剂, 该制剂包含具有疗效量的IFN-con, 以及适当的稀释剂、佐剂、载体、防腐剂和/或增溶剂。

图1-7示出了IFN-con1和对照材料INTRON A当分别按0.1、0.5、1、5、10、50以及100ng/ml 加干扰素到 ESKol 细胞悬乳液中时对 Eskol (一种多毛细胞白血病细胞系的抗增殖活性。

图8示出了用INTRON-A、IFN-con或IFN-CON1和r-met GCSF治疗卡波济氏肉瘤病人所得到的第一中值或当前中值。

在此处, 交感人类白细胞干扰素 (IFN-con) 指一种非天然存在的多肽, 它包括绝大多数与所有天然存在的人类白细胞干扰素亚型顺序相同的氨基酸残基, 并且包括在一个或多个不与所有亚型相同的氨基酸的位置上包括一种主要属于该位置的氨基酸, 并且绝不会包括在至少一种天然存在亚型中不在该位置残存的任何氨基酸残基。IFN-con包括(但不限于) 公开在共同拥有的美国专利 4695623 和 4897471的命名为IFN-con<sub>1</sub>、IFN-con<sub>2</sub>以及IFN-con<sub>3</sub>的氨基酸顺序, 在此引入这些公开内容经供参考。可以用上述的专利或其它标准方法来合成标记DNA顺序的IFN-con。

IFN-con多肽最好是转化或转染进细菌宿主(特别是E. Coli.) 中的所制造的DNA顺序的表达产物。也就是说, IFN-con是重组IFN-con在E. Coli. 中制备的IFN-con最好是用在本领域普通技术人员公知的方法纯化的, 而对于IFN-con1, 通常按Klein et al, Supra (1988) 所

述的用于IFN-con1的方法来纯化。纯化的IFN-con 可以包括多种异构体的一种混合物,比如纯化的IFN-con1由甲硫氨酰基IFN-con1、脱甲硫氨酰基IFN-con1以及带有一个阻断的末端的脱甲氨酰基的混合物组成(Klein等人, Supra(1990))。另一方面, IFN-con可包括一特异的离析的异构体。可以用本领域普通技术人员公知的等电聚焦这样的技术来使IFN-con异构体彼此分离。

本主题发明提供一种治疗一种可用用 $\alpha$ -干扰素治疗的疾病的方法,该方法同时可减少或消除了通常与 $\alpha$ 干扰素疗法有关的一种或多种副作用,它包括给病人施用具有疗效量的IFN-con。本发明的一个优选的实施例是一种治疗方法,包括施用具有疗效量的IFN-con<sub>1</sub>、IFN-con<sub>2</sub>或IFN-con<sub>3</sub>,最好施用具有疗效剂量的IFN-con<sub>1</sub>。

短语“减少或消除与施用干扰素有关的一种个或多种副作用”相信对于相关领域的普通技术人员是清楚的,并且是可以理解的。通常可以用测量干扰素疗法所带来的副作用的数目和严重程度的各种方法中的任何一种来确定,一种干扰素与另一种个干扰素的副作用图是否不同。用于与交感干扰素比较的一种合适的干扰素是Schering-Plough出售的Intron A(干扰素 $\alpha$ -2b)。

定级副作用严重程度的一般方法是采用标准标度(如世界卫生组织(WHO)承认的标准标度)。这个临床医师现在广泛使用的标度所使用的副作用等级水平如下:一级,温和的;二级,中等的;三级,严重的;四级,生命危险的。虽然在这个分级法中有一些主观性因素,如果同一临床医师把病人分组,用这种标度比较在两种药之间副作用的结果可能还是有效的,并且可为医生。为进行比较,医生常常想知

道施用给定剂量水平的一种给定的药是否会带来极限剂量毒性 (DLT)。  
当病人认为副作用无法忍受时,便认为达到了极限剂量毒性 (DLT)。  
当这种情况出现时,医生可以减少剂量(对施用Intron A或交感干扰素的情况一般每次减少3百万单位)或停病人一个时期的药,以后继续服同样剂量或较低剂量的药。在任何情况下,当出现DLT时,可以认为所达到的结果是低于最佳效力的次佳治疗结果。这样,表示副作用减少的其他途径是在一给定剂量水平DLT的减少次数。在例3中,对Intron A和交感干扰素的DLT进行了比较,虽然可使用副作用图的其他测量法,结果是相同:与其他干扰素(特别是 $\alpha$ 干扰素,例如Intron A和Roferon (Hoffmann La Roche))相比,交感干扰素带来的DLT较低,并且一般来说,在所有用于治疗疾病的剂量水平上,病人感觉都较好。

适于用IFN- $\alpha$ 治疗的疾病包括各种细胞增殖失调,特别是各种癌症。这种失调包括(但不限于)多毛细胞白血病、卡波济氏肉瘤、慢性骨髓白血病、多骨髓瘤、表面膀胱癌、皮肤癌(基细胞癌和恶性黑素瘤)、肾细胞癌、卵巢癌、低级淋巴细胞和皮肤T细胞淋巴瘤,以及神经胶质瘤。

其他适于用IFN- $\alpha$ 治疗的疾病包括各种病毒疾病,这些疾病包括(但不限于)甲型肝炎、乙型肝炎、丙型肝炎、非甲非乙型肝炎(而不是乙型肝炎或丙型肝炎)、Epstein-Bar病毒感染、HIV感染、疱疹病毒(EB、CML、单纯性疱疹)、乳头状瘤、痘病病毒、细小核糖核酸病毒、腺病毒、鼻病毒、HTLV I、HIV II,以及人类轮状病毒(human rotavirus)。

可以单独用IFN-con 或与其他治疗药物共同使用以治疗此处所述的多种疾病。例如, IFN-con可以与具有疗效量的一种或多种化学治疗剂结合施用。这些治疗剂如白血福恩、5-氟尿嘧啶(5-FU)、zidovuline(AZT)、甲酰四氢叶酸、米尔法兰, 支氢可的松环磷酰胺、decarbazine、顺铂(cisplatin), 以及潘生丁。IFN-con也可以与细胞激动素(例如内白细胞杀菌素-2(IL-2))结合施用。

可以把具有疗效量的IFN-con 与具有疗效量的一种或多种因子结合施用, 所述的这类因子在干扰素治疗期间能刺激骨髓分化, 以克服所观察到的骨髓抑制效应。这些试剂包括(但不限于)G-CSF、GM-CSF、IL-1、IL-3、IL-6、红血球生成素, 以及SCF。干细胞因子(SCF)刺激早期造血祖代细胞的增殖, 并在申请号为573616的美国专利申请中已有描述, 在此引入其公开内容以供参考。一种优选的试剂是G-CSF。

下面给出的例1-3中表明, IFN-con<sub>1</sub>是对多毛细胞白血病和与AIDS有关的卡波济氏肉瘤的一种有效的抗增殖试剂。

例1中示出了IFN-con<sub>1</sub>和INTRON A对Eskol细胞(一多毛细胞白血病细胞系)的抗增殖活性。它表明在一宽的浓度范围内, IFN-con<sub>1</sub>具有比INTRON A较大的抗增殖活性。在IFN-con<sub>1</sub>与Rofefon A 比较时也能得到类似结果。这些结果表明, 当施用浓度与INTRON A 相同时, IFN-con<sub>1</sub>的疗效较高。换句话说, 较低浓度的IFN-con<sub>1</sub>多获得与Intron A相同的疗效。

例2描述了IFN-con<sub>1</sub>和INTRON-A治疗与AIDS中的一个比较研究。它表明, 接受IFN-con<sub>1</sub>的病人达到了比接收INTRON-A 病人较高单位

的剂量。此外,接受两者和IFN-con<sub>1</sub>以及G-CSF的病人比仅接受IFN-con<sub>1</sub>那些病人达到了较高剂量的IFN-con<sub>1</sub>(见图8)。在这项研究中,所有病人都接受AZT,作为他们治疗HIV感染手段的一部分。单独施用AZT对卡波济氏肉瘤是无效的。

当施用IFN-con<sub>1</sub>时,用根据3级毒性的频率的降低可以断定,IFN-con<sub>1</sub>比INTRON-A更安全。与INTRON-A治疗法相比,用IFN-con<sub>1</sub>治疗时发生中性白细胞减少症和肝功能障碍的机会有所降低,而用IFN-con<sub>1</sub>和r-met GCSF治疗完全消除了3级毒性(见表2)。

例3给出了从包括肝炎感染的病人的临床试验获得的数据。

本发明还提供了由具有疗效量的IFN-con与可作为药物的载体、佐剂、稀释剂、防腐剂 and/或增溶剂一起组成的药物制剂。IFN-con的药物制剂包括各种缓冲剂具有一定的PH和离子强度范围的的稀释剂(如Tris-Hcl、乙酸盐、磷酸盐)的稀释剂、载体(如人类血清清蛋白)、增溶剂(如吐温、聚氧乙烯山梨醇脂肪酸酯)以及防腐剂(如硫汞撒、苄醇)。通常,药物制剂的组分可以从与干扰素以及其他抗增殖或抗病毒剂一起使用的物质中选择,而这是本领域普通技术人员所公知的。所提供的IFN-con的药物制剂以一种可注射的溶液或一种注射前在适当的稀释剂中再生的冷冻干燥粉。

本领域的普通技术人员可以根据所制备的IFN-con的半寿命、施用的过程以及待试验的是何种疾病来确定IFN-con的疗效量。通常,对治疗细胞增殖失调,IFN-con的疗效量为每个病人每星期施用几次,每次的剂量在 $2 \times 10^6$ - $60 \times 10^6$ 单位之间。用该范围内较低部分的剂量可有效地在治疗多毛细胞白血病,而用该范围内较高部分

的的剂量可有效地治疗卡波济氏肉瘤。在至少六个月的疗程内, 用具有疗效量的IFN-con, 对不同类型的肿瘤, 可使肿瘤重量减轻 20%-80%。通常, 对治疗一病毒疾病, 每周每个病人类施用几次 (例如2-7, 最好3次) 所用的IFN-con的疗效量在 $3 \times 10^6$ - $30 \times 10^6$ 单位之间, 最好在 $6 \times 10^6$ - $15 \times 10^6$ 单位之间。

给药方式最好是把区物注射到哺乳动物的血液中, 注射可以是静脉内的、肌肉内的、皮下或病灶内注射。也可以通过口服或鼻途径来施用药物。对本领域普通技术人员来说, 对给定的药物制剂, 显然应采用给定的施用方式。

所提供的下列例子更充分地说明了本发明, 但这些例子并未限制本发明的范围。

#### 例 1

##### IFN-con<sub>1</sub>和Intron A的抗增殖活性

试验IFN-con<sub>1</sub>和Intron A对Eskol细胞系 (由Dr. E. School 在 the Indiana University Medical School分离的多毛细胞白血病细胞系) 的抗增殖活性。在37℃下, 在含5%CO<sub>2</sub>的10%的胎儿腓肠血清的RPMI介质 (Gibco) 中培养3毫升ESKOL细胞的培养物。将IFN-con<sub>1</sub>或INTRO A (干扰素 $\alpha$ -2b; Schering Corp.) 加入到10 微升在最终蛋白质浓度为0.1-100ngs/ml的介质中去。用Bradford蛋白质试验法 (Bradford, Anal. Biochem. 72, 248-254 (1976)) 来测定IFN-con<sub>1</sub>的蛋白质浓度, Intron A的浓度是由制造者提供的特异活性 ( $2 \times 10^6$  国际单位/mg蛋白质) 和单位浓度而计算出的。在每隔24小时用台盼蓝 (Sigma) 排斥法测定存活细胞的数目。每隔24小时加入 100 微升



IFN-con<sub>1</sub>或Intron A直至所标明的最终浓度。存活细胞计数值是四次独立试验的平均值,每次独立试验都复制样品。细胞计数值从在24-48小时的大约5%到较长时间点的大约2%之间变化。图1-7中示出的结果是在不同时间时存在或不存在干扰素时存活细胞计数值的百分比。

通过把<sup>3</sup>H-胸苷结合到在IFN-con<sub>1</sub>或INTRON-A存在的条件下Eskol培养的细胞中的情况来证实存活细胞计数值。在120小时培养期以后,提取200微升细胞悬浮液在有5 $\mu$ Ci/ml <sup>3</sup>H-胸苷(Amersham)的条件下在37℃下培养3小时。用一Cambridge细胞收集器(Cambridge Technology)收集这些细胞,以蒸馏水洗7次,再用95%的乙醇洗2次,用液体闪烁计数法来测定结合的<sup>3</sup>H-胸苷的量。所观察到的在存在IFN-con<sub>1</sub>或INTRON-A的条件下培养120小时的Eskol细胞摄入<sup>3</sup>H-胸苷的摄入量正比于细胞存活数。

## 例 2

带卡波济氏肉瘤(KS)的病人施用IFN-con<sub>1</sub>的安全性、耐药性和效率

着手做一个随机取样的公开的放射性同位素示踪研究,来评价IFN-con<sub>1</sub>和Intron A的安全性和耐药性,并确定IFN-con<sub>1</sub>和Intron A的最大耐药剂量(MTD)。对感染AIDS的KS病人施用IFN-con<sub>1</sub>和Intron A以及Zidovudine(AZT)一起。此外,当与AZT和用E. Coli产生的在多肽(r-met G-CSF)的氨基酸末端具有一蛋氨酸残基的重组粒性白细胞群体刺激因子一起施用,测定IFN-con<sub>1</sub>的安全性、耐药性以及最大耐药剂量(MTD)。在这项研究中的三个治疗组为:

(1) Intron A+AZT

(2) IFN- $\alpha$ <sub>1</sub>+AZT

(3) IFN- $\alpha$ <sub>1</sub>, AZT+r-met G-CSF

每个治疗组至少包括12个可供研究的病人。

A. 产品说明:

用在美国专利4695623和4897471中描述的方法在E. Coli中生产IFN- $\alpha$ <sub>1</sub>。通常用Klein等人在supra(1988)中描述的步骤来纯化IFN- $\alpha$ <sub>1</sub>。在本研究中,用在磷酸钠缓冲剂中无菌蛋白溶液的 $\alpha$ <sub>1</sub>来皮下施用IFN- $\alpha$ <sub>1</sub>,如果需要的话,把制剂稀释在无菌盐水中。

Zidovudine(AZT)可从Burroughs-Wellcome Co.购买,并按包装说明书上的说明使用。

Intron A可以从Schering Corp 购买的无菌冷冻干燥剂型产品,该试剂可按包装说明书上的说明重新悬浮在稀释剂中。

r-met G-CSF是用在美国专利4810643所述的方法在E. Coli 中生产的,该专利在此引入以供参考。所制备的r-met G-CSF是一种在10mM醋酸钠5%甘露醇和0.004%吐温80中,PH为4.0、浓度为0.3mg/ml的无菌蛋白质溶液。如果需要的话,将溶液放入5%的无菌葡萄糖水溶液(D<sub>5</sub>W)中进行稀释。

B. 剂量和程序表

AZT,对所有病人按100mg的固定剂量施用AZT,每四小时口服一次,同时,清醒的病人每天共给药6次,共600mg。

r-met G-CSF:对包括r-met G-CSF的治疗组中随机选定的病人,按每天每公斤体重1  $\mu$ g/kg 的剂量以一次团块注射的方式皮下施用

r-met G-CSF。如果需要的话,该剂量可以 $1\mu\text{g/kg}$ 天(不超过 $6\mu\text{g/kg/天}$ )的增量增加或以 $0.5\mu\text{g/kg/天}$ 或更小的减量减小,选择适当的剂量,以使绝对中性白细胞计数值(ANC)在 $5000-15000/\text{mm}^3$ 的目标范围之中。

干扰素:根据剂量逐步提高的方案,使病人或者接受IFN- $\alpha_1$ ,或者接受Intron A。剂量的选择应基于每一种干扰素的等单位(equal units)。但是,因为两种干扰素的特异活性不同(按美国专利4695623所述的抗病毒细胞病试验法的测定值,对Intron A的特异活性为是 $2 \times 10^8 \text{IU/mg}$ ,而对IFN- $\alpha_1$ 的特异活性至少为 $1 \times 10^9 \text{IU/mg}$ ),对于Intron A和IFN- $\alpha_1$ 的任何给定剂量,蛋白质的重量值(以mg为单位)将是不同的。下面的表1给出了所采用的剂量逐步提高方案。在表1中还给出了对每种干扰素相应于用IU表示的每个剂量水平的,以蛋白质的毫克数为单位的剂量水平。

表I. Intron A和IFN- $\alpha_1$ 剂量逐步提高程序表

剂量水平	剂量 $\times 10^6$	用毫克蛋白质表示的剂量	
		INTRON A	IFN- $\alpha_1$
1	3	0.015	0.003
2	9	0.045	0.009
3	12	0.060	0.012
4	15	0.075	0.015
5	18	0.090	0.018
6	21	0.105	0.021
7	24	0.120	0.024

8	27	0.135	0.027
9	30	0.150	0.030

对上面给出的三个治疗组中每一组中的病人施用IFN- con ,或INTRON-A, 开始的第一周每天的剂量为1级, 然后逐步提高到下一个高剂量水平。在第8、15、22、29、36、43、50和57 天提高剂量。剂量的逐步提高一直持续到每个病人接受了一MTD或每天 $30 \times 10^6$  IU 干扰素的最大剂量。对于单个病人, MTD指低于出现极限剂量毒性的那个剂量水平。毒性用世界卫生组织严格确定并由 Miller 等人 Cancer 47, 210-221 (1981) 中进一步描述的分级法可以分为0级(无毒性)到4级(急性毒性)。极限剂量毒性指确定为至少可能与干扰素有关的3级或4级有害事件。不能用持续时间少于24小时的发烧和发冷、疲劳、头痛、或2级或更低级的毒来确定MTD, 除非可以确定某个病人已无法容受该剂量。

在剂量逐步提高至最高时, 对病人们每日一次继续施用MTD或 $30 \times 10^6$  IU最大剂量(如果达到的话)以进行维持治疗。维持治疗一直持续疾病发展或者达到其他可以将病人从该项研究中除去的标准。

在维持治疗期间, 由于毒性的原因, 允许干扰素的剂量降低两次。在剂量降低两次后, 不允许进一步改变干扰素的剂量, 而需要进一步降低剂量的病人需从该项研究中撤出。对这个步骤的一个例外是: 极限剂量毒性造成了中性白细胞减少症(在大约一周时间内有两天  $ANC \leq 1000/mm^3$ )。在这种情况下, 允许该病人留在该研究中而不进一步减少干扰素剂量, 但须对不接受r-met G-CSF病人皮下给药以进行r-met G-CSF治疗, 开始时的用药量为每天每公斤体重1微克。对

已在r-met G-CSF治疗组的病人,施用的r-met G-CSF 剂量将逐步提高到下一个较高水平(1微克/kg体重/天)。

### C. 病人的选择

在这项研究中共登记了49个病人。在这项研究每个人必须满足所有包括的和排除的判据才能给予登记。重量的包括判据有:血清诊断证明的HIV感染、病理组织证实的具有可测出的皮肤或口腔损害的卡波济氏肉瘤、可接受的免疫功能(用CD<sub>4</sub>淋巴细胞水平测量)以及在AZT治疗的时间少于1年。

从这项研究中撤出一个病人的理由为:在剂量逐步提高过程中第二次出现3级或更高级的毒性、在已确定病人出现MTD后第三次出现极限剂量毒性,并且病人在接受维持治疗,或者KS在进一步发展。

### D. IFN-con<sub>1</sub>和Intron A的MTD的确定

在开始研究的第1-9周采用上面的剂量逐步提高方案,然后进行维持治疗,在适当的时候减少剂量,对三个治疗组确定INTRON- A 和IFN-con<sub>1</sub>的第一和当前的MTD,结果在图8中示出。每个组由15个病人组成。第1组(Intron A和AZT)在剂量以 $9 \times 10^6$  IU逐步提高期间得到第一MTD,并在剂量以 $6 \times 10^6$  IU逐步提高时得到一当前MTD;第2组(IFN-con<sub>1</sub>和AZT)当剂量以 $15 \times 10^6$  IU 逐步提高时得到第一和当前MTD;而第3组(IFN-con<sub>1</sub>、r-met G-CSF和AZT)分别在 $24 \times 10^6$  IU和 $21 \times 10^6$  IU的条件下得到第一和当前MTD。

### E. Intron A和IFN-con<sub>1</sub>治疗的安全性评价

Intron A和IFN-con<sub>1</sub>治疗的安全性用需要减少干扰素剂量的负作用的严重程度来确定。这些结果汇总在表2中。

表2. 在三个治疗组中毒性促使的剂量减少

	出现频率(%)		
	Intron A	IFN-con <sub>1</sub>	IFN-con <sub>1</sub> 和 r-met G-CSF*
2级耐量 (类似流感综合症)	20	70	65
3级中性 白细胞减少症	40	10	0
3级 肝功能试验	30	10	0

\*对IFN-con<sub>1</sub>, 以及IFN-con<sub>1</sub>和r-met GSCF治疗组百分比不能达到100%, 因为在这些组中有些病人在达到 $30 \times 10^6$  IU的最大剂量时没有出现副作用。

因为这项研究是开创性的, 没有病人由于施用Intron A或IFN-con<sub>1</sub>明显引起的毒性结果撤出。

#### F. IFN-con<sub>1</sub>和INTRON-A治疗效率的确定

抗肿瘤响应: 在治疗四个月以后用the AIDS Clinical Trials, Group (ACTG) Oncology Committee 的标准响应判据评价抗肿瘤响应 (Krown等人, J. Clin. Oncol. 1, 1201-1207 (1989))。

免疫功能: 在评价病人对HIV感染的免疫响应研究中, 在6个月中的每个月对CD4淋巴细胞进行计数。

在所有三个治疗组中, 卡波济氏肉瘤损伤响应和CD4淋巴细胞水平是相当的。

例 3

对患丙型肝炎 (HCV) 的病人施用 IFN- $\alpha$ 1 的安全性、 耐药量以及效力。

改进剂量耐受性: 用第一类干扰素治疗会引起几种副作用, 这些副作用对患一特殊疾病的病人而言将限制其可能接受的绝对剂量。这些副作用包括: 流感类综合症、 腹泻、 骨髓抑制、 试验发现的肝功能的提高、 以有精神状态失调。这些毒性是根据世界卫生组织 (WHO) 的标准 I 级 (温和的), II 级 (中等的), III 级 (严重的) 以及 IV 级 (有生命危险) 来评定的。由第一类干扰素治疗的毒性可从 I 级-IV 级, 如果病人或医生认为剂量已大到病人无法忍受在第一类干扰素治疗过程中引起的任何毒性医生将减少剂量或改变剂量施用方案。施用剂量的这种改变使治疗方式并非最佳方式, 得到的结果也低于最佳效果。使用交感干扰素可使施用量达到最佳剂量, 并在整个治疗过程保持该剂量而不会引起任何给别的极限剂量毒性。

进行用交感干扰素治疗慢性丙型肝炎感染的临床试验, 以便研究该药几个剂量的施用效果。把用交感干扰素治疗病历与患类似疾病的病人的病历及人口统计特性的资料、 同一主要研究者用干扰素- $\alpha$ -2a (Roferon) 或干扰素- $\alpha$ -2b (Intron A) 进行治疗的资料进行比较。

研究计划: 这项研究包括至少 30 个受 HCV 感染后而使丙氨酸转移酶 (ALT: 一肝酶) 水平出现升高的病人 (至少高于正常上限 1.5 倍) 。在这项研究中正常的上限是 35 毫单位/毫升 (35 mU/ml)。此外, IFN- $\alpha$ 1 的效力可以用 RCR 分析法测定抗病毒活性及测定治疗过程中 ALT 值来加以评价。最后, 将用其他重组的  $\alpha$  干扰素 (特别是重组

干扰素  $\alpha$ -2a (Roferon) 以及  $\alpha$ -2b- (Intron A) 的HCV 临床研究的过去的资料与引项研究中的资料进行比较。

在表3中总结了登记在IFN-con<sub>1</sub>剂量组之一的适当的病人。

表 3

IFN-con <sub>1</sub> 剂量 (百万单位, MU)	剂量/7天 (周*)	病人数
3	3	5
6	3	5
9	3	5
12	3	5
15	3	5

\*: 至少48小时后才可区别出剂量的不同。

顺序选择几个剂量组, 各剂量组之间有两周的间隔。具体地说, 5个病人进入第一组, 如果没有观察到可归于IFN-con<sub>1</sub>的III级或更高级的毒性, 则对其在两周安全期的表现进行评价, 5个病人进入下一组 (6MU)。但是, 如果观察到有病人出现可归因于IFN-con<sub>1</sub>的III级或更高级的毒性反应, 再追加3个病人进入该第一组, 并且评价其两周的表现。如果没有发现可归因于IFN-con<sub>1</sub>的额外的III级或更高级的毒性, 再把这些病人编入下一组 (6MU)。但是, 如果观察到任何额外的可归因于IFN-con<sub>1</sub>的III级或更高级的毒性, 则这些病人不能进入下一较高剂量组 (6MU)。按照上述将病人逐步编入9、12、15、18以及24MU组。此外, 如果发现有两个或更多的病人任何剂量水平出现可归因于IFN-con<sub>1</sub>的III级或更高级的毒性, 就不应追加病人进入该组, 而且对已经编入该组进行研究治疗的病人或者正接受



更高剂量水平治疗的病人, 应把剂量减少到出现2个或更多个III级或更高级毒性水平的剂量水平之下。然而, 可以继续把其他病人追加进出现两个或更多个III级或更高毒性的剂量水平的组 (追加病人的总数最多为10个)。

如果在开始评价的两周内或两周以后在任何组中发现出现可归因于IFN- $\alpha_{n1}$ 的III级毒性反应的病人, 应暂停施用IFN- $\alpha_{n1}$ , 直到毒性减少到II级或更低。然后把剂量恢复到略低的剂量水平上继续治疗。如果病人出现III级毒性反应时正接受3MU剂量的治疗, 治疗随后应在2MU水平上继续进行。如果发现有病人出现可归因于IFN- $\alpha_{n1}$ 的IV级毒性, 应把该病人从此项研究中撤出。在整个研究治疗过程中, 允许病人的剂量减少3次 (但减少后的剂量不应低于2MU的剂量水平)。任何因毒性反应需将剂量减少四次的病人都应从研究治疗中撤出。出现持续时间少于24小时的发热和发冷、疲劳、头痛或者出现II级或更低级毒性时不应认为达到了极限剂量毒性, 除非确定该病人也无法忍受。药物可以由病人自己在家施用, 或者由第三者 (经全面的培训合格后) 帮助施用。

评价病人对ALT剂量水平变化的响应, 应观察三个月。

结果:

将病人编入上述组中。在最初的2周内, 对于3、6、9及12MU剂量组, 没有发现任何病人出现极限剂量毒性。在施用药物的最初2周内, 发现一个接受16MU治疗的病人出现极限剂量毒性反应。所观察到的毒性是无法忍受的II级“流感类综合症”。将该病人的剂量降低到12MU。

对每个组, 在12周治疗期间极限剂量毒性和历史IFN-con- $\alpha$ 2的病人如下:

表 4

	IFN-con <sub>1</sub> 剂量 (MU)	DLT的百分比	毒性
n=4	3	0	-
n=5	6	0	-
n=5	9	0	-
n=5	12	20%	‘流感类’
n=5	15	20%	‘流感类’
n=19	3MU IFN- $\alpha$ 2	32%	‘流感类’

如上表所述, 每周接受3次3至15MU剂量之间的IFN-con<sub>1</sub>的病人比接受IFN- $\alpha$ 2的病人出现极限剂量毒性的次数少。因为在这项研究中, IFN- $\alpha$ 2的剂量只能到3MU, 所以无法与更高剂量水平的IFN- $\alpha$ 2进行临床比较。但是可以预计, 对接受更高的剂量水平IFN- $\alpha$ 2治疗的病人, 出现极限剂量毒性反应的数量会大大增高。

表 5

治疗12周后的反应

	IFN-con <sub>1</sub> (百万单位)	反应率*
n=4	3	25%
n=5	6	60%
n=5	9	80%
n=5	12	60%

n=4	15	75%
n=19	3MU IFN- $\alpha$ 2	47%

•完全或部分反应

如由上表所述,每周接受3次3至15MU之间剂量的IFN-con<sub>1</sub>的病  
人的ALT反应率至少与用3MU的IFN- $\alpha$ 2治疗时所观察到的指标相同。

上述结果证明,与IFN- $\alpha$ 2疗法相比,IFN-con<sub>1</sub>疗法的效力率更  
高,同时耐药性也更好。

虽然上面已以实施例的形式对本发明进行了叙述,可以理解,本  
领域普通技术人员可以对之进行各种变化和改进。因此,希望下面  
所附的权利要求能覆盖所有这些与本发明权利要求保护范围等效的  
变化。

图 1

在 $0.1\text{ ng/ml}$  IFN-con1 和INTRON-A的抗增殖活性

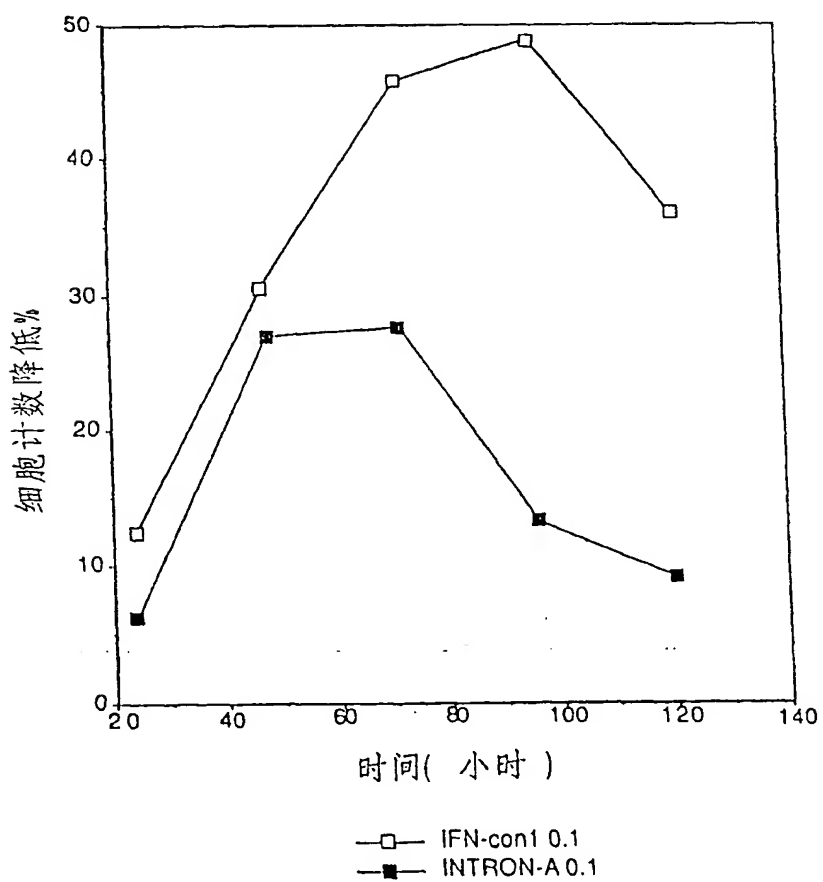


图 2

在0.5ng/ml IFN-con1 和INTRON-A的抗增殖活性0.5ng/ml

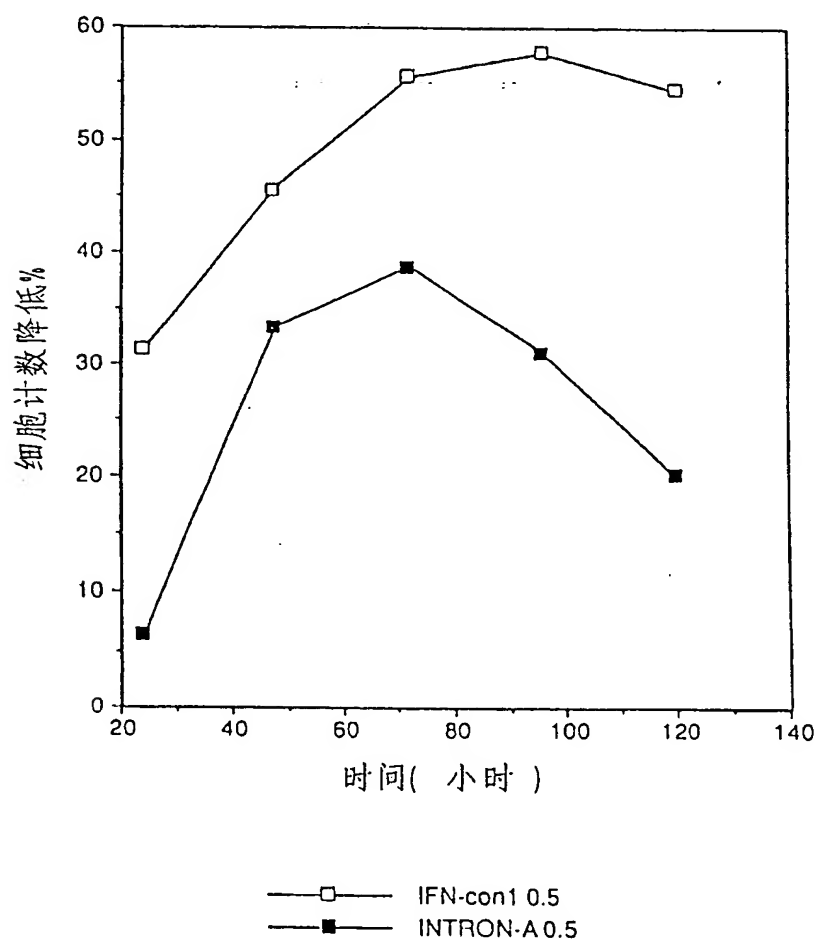


图 3

在 1 ng/ml IFN-con1 和 INTRON-A 的抗增殖活性 1 ng/ml

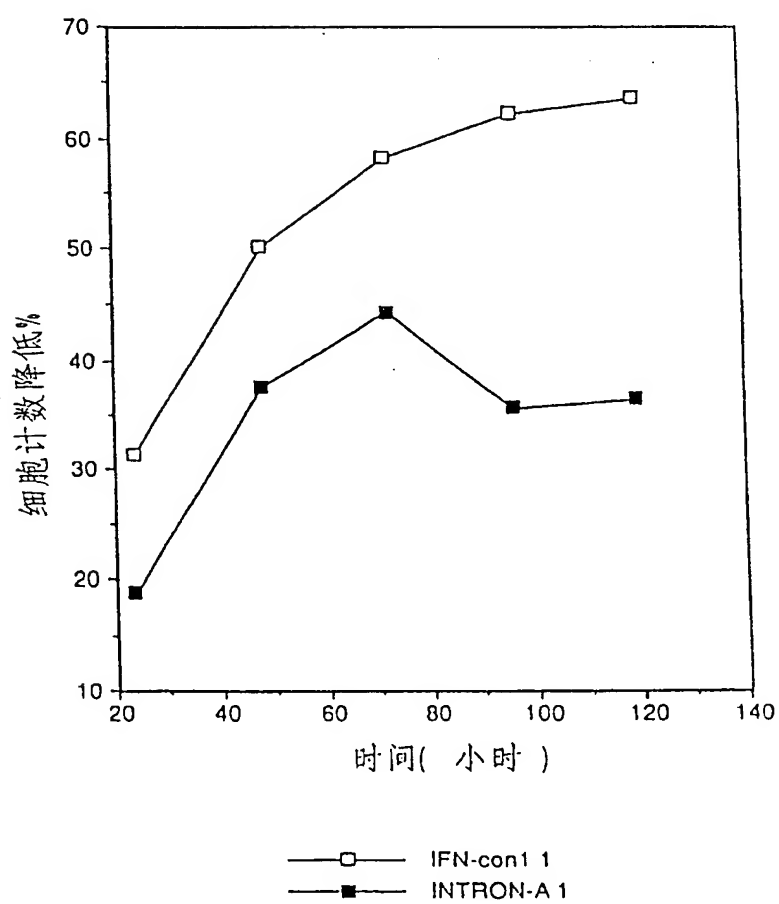


图 4

在 5 ng/ml IFN-con1 和 INTRON-A 的抗增殖活性 5 ng/ml

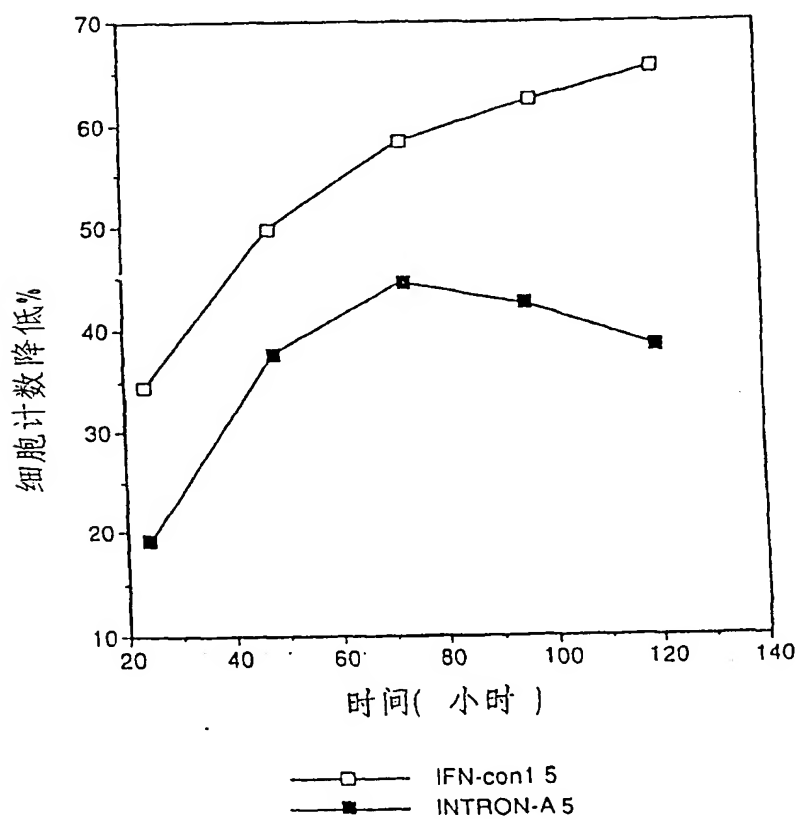


图 5

在 10 ng/ml IFN-con1 和 INTRON-A 的抗增殖活性 10 ng/ml

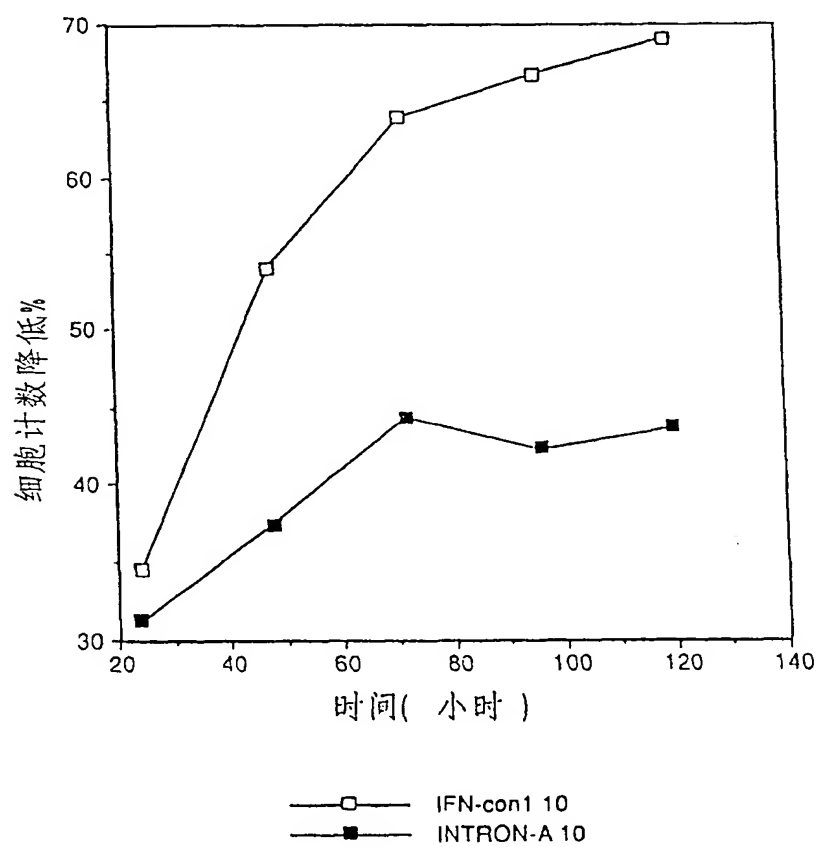




图 6

在 50 ng/ml IFN-con1 和 INTRON-A 的抗增殖活性 50 ng/ml

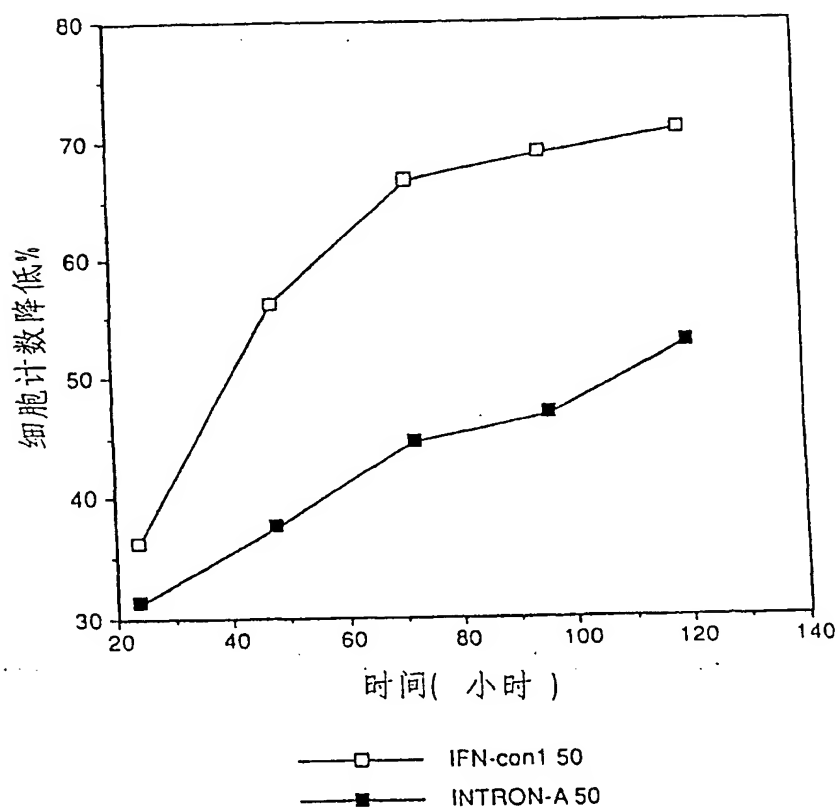
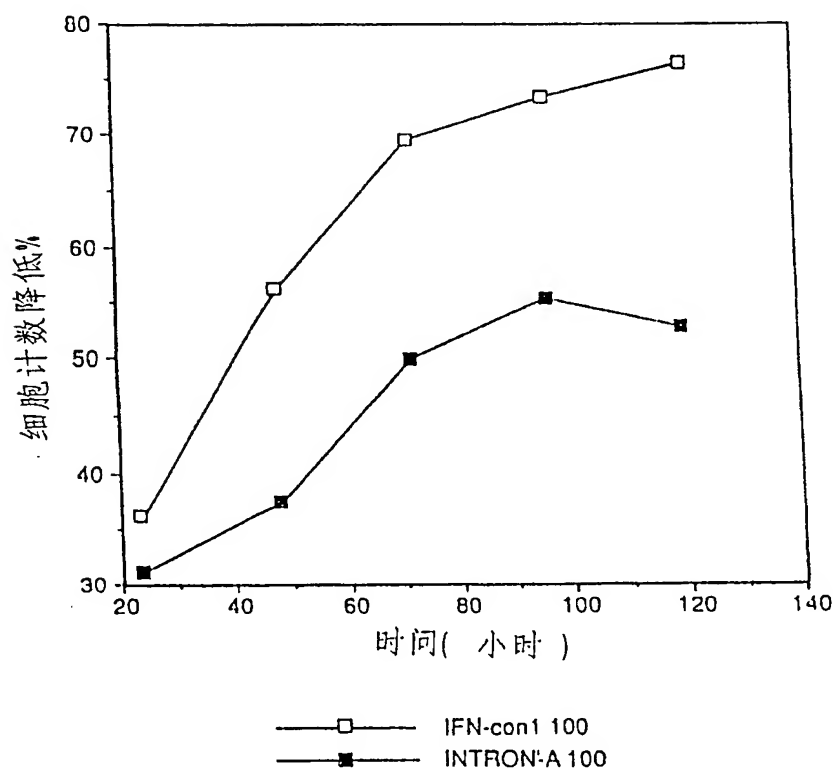


图 7

在100 ng/ml IFN-con1 和INTRON-A的抗增殖活性100 ng/ml



对三个治疗组中值最耐药剂量(MTD) (按百万单位)

图 8

